



Sistema Integrado de Gestión

GUÍA PRÁCTICA N° 47

**DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO EN HÍGADO Y MÚSCULO
FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DEL DEPORTE 2**

Versión 1

Código: IV.4.1.19.03.52

Proceso: Investigación - IV

Febrero de 2017

 INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 2 de 10

1. OBJETIVOS

- Determinar cualitativamente los niveles de glucógeno en diferentes tejidos animales hígado-músculo (Vaca, Cerdo, Pollo)
- Realizar analogías de acuerdo con los niveles (cualitativos) de glucógeno obtenidos en la práctica, a demás de realizar estimaciones sobre el nivel de glucógeno obtenido en la práctica con los reportados en los seres humanos
- Integrar lo aprendido en clase sobre los requerimiento energéticos de acuerdo a la actividad física realizada, los estadios metabólicos durante los estados de ayuno y de dieta balanceada (normal) con los niveles cualitativos de glucógeno obtenidos en la práctica

2. ALCANCE

Comprender y profundizar mediante la práctica los conocimientos adquiridos en clase, a demás de correlacionar con aspectos propios de la práctica deportiva, esta guía esta dirigida a los estudiantes de deporte, sin embargo es aplicable a los estudiantes de Fisioterapia, Nutrición y Dietética, Terapia Ocupacional y otros.

3. DEFINICIONES

CONCEPTOS PRELIMINARES QUE SE DEBEN REVISAR ANTES DE LA PRÁCTICA: Glucogéno, Glúcidos, Hidratos de carbono, enlace glucosídico, Hígado y sus partes, polisacáridos, gasto energético, concentración muscular y hepática de glucogéno en seres humanos

4. CONDICIONES GENERALES

Condiciones que debe cumplir el estudiante y docente antes de cada practica: Se debe asistir a la práctica con el diagrama de flujo, la bata de laboratorio blanca, el trapo o la toalla para limpiar y secar, la cinta de papel o el lápiz vidrio gráfico.

 INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 3 de 10

5. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

5.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Los seres vivos almacenan glúcidos en forma de polisacáridos, que sirven como materiales de reserva. El almidón, la inulina en los vegetales superiores y el glucógeno en los animales.

El glucógeno consta de cadena de glucosa unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ y ramificaciones, cada 8 ó 10 unidades, de glucosa mediante enlace glicosídico $\alpha(1-6)$.

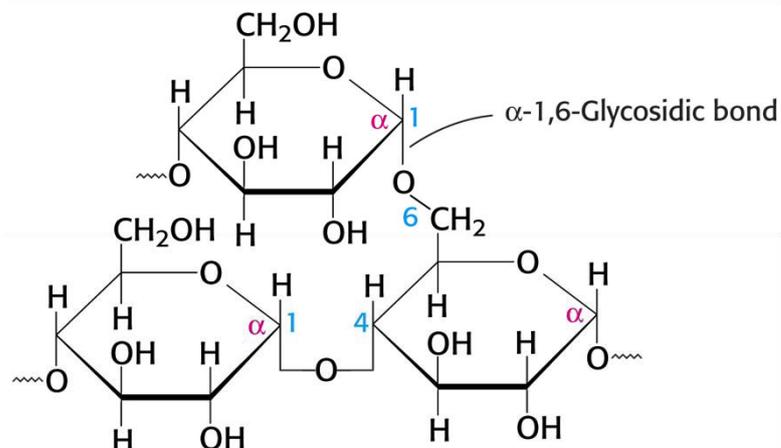
Enlace glicosídico $\alpha(1-6)$

El glucógeno es especialmente abundante en el hígado en donde puede ocupar hasta un 10% de su peso y en músculo, un 1%. En situación de ayuno, el glucógeno es la primera reserva que se moviliza para mantener la glucemia, al menos durante dos horas.

La extracción del glucógeno del hígado de esta práctica implica un proceso de homogenización del tejido y ruptura celular, así como la extracción y la eliminación de las proteínas (desproteínizar) para evitar interferencias en los análisis posteriores. Para la valoración posterior de la glucosa (que en esta práctica solo se realizará de forma cualitativa) hay que someter al precipitado de glucógeno a una hidrólisis ácida, de esta forma se rompen los enlaces glicosídicos y se libera glucosa. La valoración cualitativa de la cantidad de glucosa presente en cada hidrolizado se realizará con una sal de cobre (II) en medio alcalino (Reactivo de Nelson), aprovechando el carácter reductor que tienen todos los monosacáridos.

La reacción que tiene lugar será:

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA  ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 4 de 10



Cu^{2+} (color azul) glucosa pH>8 Cu_2O (precipitado de color lila-rojizo)

5.2 PROCESO DE LA PRÁCTICA.

Antes de empezar la práctica el docente dará una explicación previa al desarrollo del laboratorio donde presentara los equipos, los reactivos, los materiales que se utilizaran durante la práctica, explicando que cuidados se deben tener y las normas de bioseguridad para evitar cualquier accidente.

5.3 MATERIALES Y EQUIPO

Material

- Tubos de ensayo de vidrio o plástico translúcido
- Tubos de vidrio graduados
- Pipetas
- Centrífuga de mesa
- Papel indicador de pH
- Cubetas de Hielo

Reactivos

- KOH al 30%
- Na_2SO_4 15%

	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 5 de 10

- Alcohol etílico
- H₂SO₄ 5N y 1N
- NaOH 5N
- Fenolftaleína (en etanol)
- Tampón fosfato 0,2 M, pH=7.4.
- CuSO₄ al 1%
- Na₂CO₃ al 2% en NaOH 1M

5. 4 PRÀCTICA - PROTOCOLO A REALIZAR

Paso 1: Extracción y purificación del glucógeno

1. Extracción del glucógeno de una muestra de hígado y músculo de vaca, cerdo y pollo.
2. Pesar aproximadamente 1 g de cada muestra y macerarlos hasta que la muestra quede lo más fina posible
3. Introducir los fragmentos de las muestras maceradas en los tubos de ensayo (de 10 ml, de vidrio o de plástico translúcido).
4. Añadir a cada tubo 2 ml de KOH al 30% .
5. Incubar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos con agitación ocasional, hasta la completa digestión del tejido (procure que no queden partículas en suspensión).
6. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos de tejido no digerido.
7. Pasar cuidadosamente los sobrenadantes (con una pipeta o por decantación) a los tubos de vidrio graduado y previamente pesados, a los que se les añaden 0,2 ml de Na₂SO₄ al 15%, y 4 ml de alcohol etílico. Agitar cuidadosamente la mezcla para poner en contacto a todos los componentes. Dejar reposar en hielo 15-20 minutos, para provocar la precipitación del glucógeno extraído.
8. Centrifugar 5 minutos a 3000 r.p.m. para sedimentar el glucógeno.
9. Desechar con sumo cuidado el sobrenadante y retener el precipitado o sedimento de color marrón-blanco, puesto que esto es el glucógeno.
10. Anotar el volumen del glucógeno extraído y purificado.

 INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 6 de 10

Nota: La purificación completa del glucógeno implicaría tres o cuatro precipitaciones alcohólicas y una precipitación ácida, pero en esta práctica haremos sólo una precipitación alcohólica.

Paso 2: Hidrólisis ácida del sedimento de glucógeno

1. Al sedimento de glucógeno obtenido en el tubo graduado, se le añade 1 ml de H₂SO₄ 5N para proceder a su hidrólisis ácida y para ello se calienta la disolución cuidadosamente a 100°C durante 45 minutos. Como el ácido puede saltar en la ebullición, es conveniente poner en la parte superior del tubo papel de filtro enrollado, para que absorba el ácido si éste salta y evitar riesgos. Tener en cuenta que en este tratamiento es donde se está obteniendo la glucosa que después se puede valorar, por lo cual no conviene perder muestra.
2. Enrasar a 2 ml con agua destilada y añadir 2-3 gotas de fenolftaleína para que actúe de indicador en la posterior neutralización.
3. Añadir gota a gota NaOH 5N y agitar bien hasta que se obtenga un pH 8 o superior. Se debe comprobar el pH de la muestra con papel indicador.
4. Anotar el volumen de la disolución, hidrolizado de glucógeno, puesto que es la disolución problema donde se va a comprobar la presencia de glucosa proveniente del glucógeno extraído.

Paso 3: Medida cualitativa del contenido de glucosa

1. Se disponen de los tubos de plástico en los que se introduce 0,5 ml del hidrolizado de glucógeno de cada muestra.
2. Se añade a cada uno 0,5 ml de sulfato de cobre.
3. Observar y anotar lo que ocurre en cada tubo.

7. REREFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Plumer, D.T. Introducción a la bioquímica práctica. México. McGraw-Hill, Latinoamericana S.A.
- Hayashi, S., Kumagai, A. (2008) Studies on eel liver functions using perfused liver and primary cultured hepatocytes. Aqua-BioSci. Monogr. 1(2):1-57.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., 2005. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Segunda Edición. España. 1152
- Orji R.C.A Effect of Transportation Stress on Hepatic Glycogen of Oreochromis niloticus (L.) Naga, The ICLARM Quarterly (http://www.worldfishcenter.org/Naga/na_2279.pdf)

 INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 7 de 10

REPORTE DE PRÁCTICA

PRÁCTICA # DETERMINACION DE GLUCOGENO EN HIGADO Y MUSCULO

PRESENTADO POR:	
1 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>	2 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>
3 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>	4 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para el informe de laboratorio cada grupo de estudiantes debe presentar un informe según los lineamientos dados en clase, como mínimo el informe debe contener:

1. Resumen (0,42)
2. Introducción (0,42)
3. Metodología (0,42)
4. Resultados (0,83)
5. Discusión de resultados (0,83)
6. Conclusiones de acuerdo a los objetivos planteados en la práctica (0,83)
7. Referencias bibliográficas (0,42)
8. Respuestas del cuestionario (0,83)

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál será el papel del KOH al 30% en esta práctica?
2. ¿Qué rendimiento se obtiene de glucógeno cada una de las muestras?
3. ¿Cómo se comprueba en esta práctica la presencia de glucosa?
4. ¿Se observa alguna diferencia entre los dos hidrolizados de las diferentes muestras? Justifique la respuesta.
5. ¿Qué diferencias y similitudes encuentra entre los niveles (Cualitativos) de glucógeno las diferentes muestras? Realice una comparación con el nivel de glucógeno en músculo e hígado de los seres humanos y los animales analizados?.
6. Justifique la acción del glucógeno muscular y hepático en deportes de velocidad y resistencia, dé ejemplos en cada caso.

 <p>INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE</p>	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 8 de 10

 INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA NACIONAL del DEPORTE	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 9 de 10

RESULTADOS

Muestras a evaluar	Volumen de la extracción de glucógeno	Volumén de la solución hidrolizada	Medida cualitativa de glucosa
Hígado de res			
Músculo de res			
Hígado de cerdo			
Músculo de cerdo			
Hígado de pollo			
Músculo de pollo			

	GUÍA PRÁCTICA N° 47 DEPORTE	Código: IV.4.1.19.03.52
		Fecha: 22/02/2017
		Versión: 1
		Página 10 de 10

8. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN

Esta Guía será actualizada por el Docente encargado de la práctica en el laboratorio, revisado por la Dirección Técnica de Investigaciones y la Vicerrectoría Administrativa, esta última como Representante de la Dirección para el SIG, y aprobado por el Vicerrector Académico.

Aprobación del Documento				
	Nombre	Responsable	Firma	Fecha
Elaboró	Diana Carolina Zambrano	Docente Bioquímica		21/02/2017
Revisó	Olga Cecilia Suárez	Director Técnico de Investigaciones		21/02/2017
	María Isabel Andrade	Representante de la Dirección del SIG		
Aprobó	Roger Micolta Truque	Vicerrector Académico		22/02/2017

Control de los Cambios			
Versión No.	Fecha de Aprobación	Descripción de los Cambios	Justificación del cambio